

51 Int. Cl.³
C 12 P 17.18
(C 12 P 17.18
C 12 R 1.465)

派別記号

庁内整理番号
7258-4B

13 公開 昭和58年(1983)5月12日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

14 抗生物質 B-41 D、E 及び G の製造法

21 特 願 昭56-178061
22 出 願 昭56(1981)11月6日
23 発 明 者 小野道久
東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社醸酵研究所内
24 発 明 者 滝口洋
東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社醸酵研究所内

25 発 明 者 三島洋
東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社醸酵研究所内
26 発 明 者 寺尾道也
東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社醸酵研究所内
27 出 願 人 三共株式会社
東京都中央区日本橋本町3丁目
1番地の6
28 代 理 人 弁理士 梶出庄治

明 細 書

1 発明の名称

抗生物質 B-41 D、E 及び G の製造法

2 特許請求の範囲

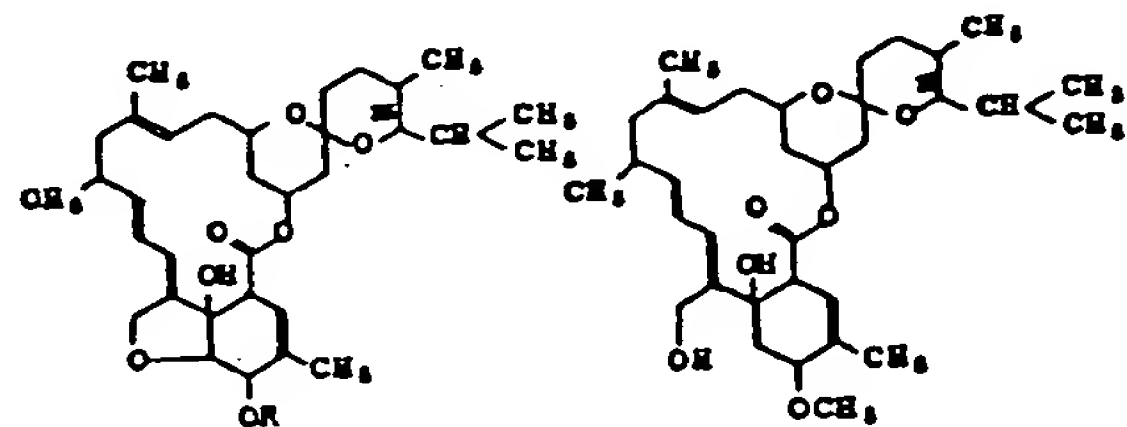
- 1 ストレプトマイセス属に属する抗生物質 B-41 生産菌を培養して B-41 D、E 及び G を製造するに際し、ペリン、イソ酪酸、イソ吉草酸、2-ケトイソ吉草酸、イソカブロン酸、これら酸の塩またはエステル、イソブタノール及びそのエステルから選ばれた1種または2種以上を培地に添加することを特徴とする B-41 D、E 及び G の製造法。
- 2 B-41 生産菌がストレプトマイセス属 B-41-146 株である特許請求の範囲第1項記載の製造法。
- 3 B-41 D を製造するための特許請求の範囲第1項記載の製造法。
- 4 ストレプトマイセス属 B-41-146 株を、L-またはD-ペリン、イソ酪酸、2-ケトイソ吉草酸およびこれらの酸の塩またはエス

テルから選ばれた1種または2種以上を添加した培地に培養して B-41 D を製造する特許請求の範囲第1項記載の製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は駆虫剤及び殺ダニ剤として有用な抗生物質 B-41 D、E 及び G を工業的に有利に製造する方法に関する。

B-41 D、E 及び G は、ストレプトマイセス属に属する B-41 生産菌、例えば B-41-146 株の培養によつて得られる抗生物質であつて、次の構造式を有し。



B-41 D: R-H

B-41 E

B-41 G: R-CH₃

生するメニの酸は特に有効であることは、特開
昭 35-3 号公報、特開昭 35-133141 号特
許証及び特開昭 35-1881 号明細書に知られて
いる。

ところで、通常の方法で B-41 生産菌を培養
した場合、上記製造式に対応して 2 3 位がメ
チル基である B-41 A₁、A₂、B₁ 及び 25 位がエ
チル基である B-41 A₃、B₂、B₃ などを同時
に生産するため、2 3 位がイソプロピル基であ
る最も活性な B-41 D、E 及び F をより収率よ
く生産する方法が望まれる。

本発明者等は、B-41 生産菌を培養するに際
し、培地に特定の物質を添加することにより、
B-41 D、E 及び F が高収率で生産されること
を見出した。

本発明は、ストレプトミセス属に属する B-
41 生産菌を培養して B-41 D、E 及び F を製
造するに際し、バリン、イソ酪酸、イソ酪酸、
2-ケトイソ酪酸、イソカプロン酸、これら

トリウム塩、カリウム塩などがあげられ、エス
テルとしてはメチル、エチル、n-ブチルのよ
うな低級アルキルエステルまたはベンジルエス
テルがあげられる。イソブチノール及びそのエ
ステルも用いることができ、エステルとしては
酢酸、プロピオン酸のような低級飽和脂肪酸と
のエステルがあげられる。上記添加物の「C」
ラベル化合物を用いた実験では生成物の 2 3 位
にイソプロピル基が特異的に取り込まれている
ことが確認された。

培地に対するこれらの添加物の添加量は一般的
には 0.001~1 g/l、好ましくは 0.005~0.01
g/l が添加される。添加時期は培地の調製時
または培養中の適宜の段階で添加してもよい。

B-41 生産菌の培養に用いられる培地は該微
生物が利用しうる栄養源を含むものならよく、上記
添加物を添加するほか、炭酸源としてはグルコー
ス、シロシ、澱粉、グリセリン、水あめ、糖蜜、
大豆油などが使用され、窒素源としてはスクイ
ム、大豆粉、小麦胚芽、肉エキス、ペプトン、

の酸の塩またはエステル、イソブチノール及び
そのエステルから選ばれた 1 種または 2 種以上
を培地に添加することによって得られる B-41 D、
E 及び F の製造法である。

B-41 生産菌、例えばストレプトミセス属 B-
41-146 株は通産省工業技術院微生物工農技
術研究所に微生物番号 1438 号として寄託さ
れており、その菌学的性状は特開昭 35-20412
号公報に詳しく記載されている。本発明におい
て使用する菌は、上記 B-41-146 株を例え
ば 2 週間、紫外線照射、放射線照射、人工炭
酸源を用いて人工炭酸したものであつて、B-
41 D、E 及び F の生産能を有するものは包含さ
れる。

本発明の方法において培地中に添加するバリ
ンは L 体又は D 体の光学異性体が用いられる。
バリン、イソ酪酸、イソ酪酸、2-ケトイソ
酪酸、イソカプロン酸のうちでは L-または
D-バリン、イソ酪酸、2-ケトイソ酪酸は
好適に用いられる。これらの酸の塩としてはナ

トリウム塩、コークスチープ・リカー、硫酸アン
モニウム、硝酸アンモニウム等が使用される。
このほか必要に応じて炭酸カルシウム、食塩、
塩化カリ、リン酸塩などを添加することができる。

培養法としては、一般の微生物を培養する
方法と同じく液体培養法、とくに炭酸培養法が
最も適している。培養は好気的条件下で行なわ
れ、培養に最適な温度は 22~30℃ であるが
多くの場合 28℃ 付近で培養する。培地の pH
は概ね pH 5.5~6.5 の間でよく、望ましくは pH
約 5.5~7.5 の中性近傍でよりよい結果をうるこ
とができる。培養は B-41 D、E および F の蓄
積量が最大となる迄行なうが、これに要する
時間は、培養の方法、温度、培地の組成など条
件によつて差はあるものの、通常約 5~15 日
程度である。

B-41 各成分の検定にあつては次の方法が
用いられる。すなわち、培養物 3 ml を小試験管
にとり、アセトン 1 ml を添加液として抽出し
遠心分離する。ここで得られた上澄の 1.0~2.0

をTLC用板（メルク社製、Silica 60 F254）
上の所定の位置に塗布せしめ、これをジオキサン：四塩化炭素（10：82）で4時間展開後、
二重長クロマトスクリーンを用いて24500の波長
（ブランクは380nm）で測定し、その吸収量を
標準物質のそれと比較し、算出する。

B-41 D、EおよびFを培養液から採取する
にあたっては、活性炭、アルミナ、シリカゲル
などの吸着剤、ダイヤイオンHF-10、HP-20
（三愛化成社製）などの交換樹脂、アビセル
（旭化成社製）、尸結などの滅菌剤、イオン交
換樹脂、イオン交換樹脂尸滅菌剤などが使用され
うるが、以下に示す採取方法が最も効果的であ
る。

培養物を、けいそう土などの尸滅菌剤を用い
て尸別し、ここで得られたクーキをメタノール
抽出することにより、目的物はメタノール中に
溶解してくる。これに水を加えた後、ローヘキ
サンで抽出し、これを減圧下で濃縮することによ
り、目的物を含有するオイル状物質が得られ

る。これをシリカゲル（ウコーゲルC-200）
のカラムで分離せしめ、ローヘキサン：アセト
ン（55：45）で抽出し、B-41 Dを含有するフ
ラクシオン、B-41 Eを含有するフラクシオン
およびB-41 Fを含有するフラクシオンを濃め
る。各フラクシオンは減圧下で濃縮し、ここで
得られた濃縮物を少量のローヘキサン：酢酸エチ
ル（20：1）に溶解し、逆相に放置するとB-
41 D、B-41 E、B-41 Fがそれぞれ結晶状
に得られる。

本発明の方法によれば特にB-41 D、Eおよ
びF成分の生成比率が非常に高く、また生成量
も増大するので、分離精製が容易になり工業生
産上きわめて有利な方法である。

以下実施例を挙げて、本発明を具体的に説明
する。

実施例1

培養地（シュクロース1g、ポリペプトン
0.3g、 K_2HPO_4 0.05g）100mlを500mlエ
レンマイヤーフラスコに分注し、振盪後、B-

41-146株を1日全量接種し、48時間28℃
で培養し、種培養とした。

この1mlを主培養地（グルコース4g、大豆粉
1g、スクイミルグ1g、 $NaCl$ 0.3g、コーン
ステープ・リカー 2g及び $CaCO_3$ 0.05g）20
ml含む100mlエレンマイヤーフラスコに接種
し、28℃で3日間培養したのち、DL-
バリン-2- ^{14}C を0.01 μ Ci/mlになるように添
加し、さらに2日間培養した。培養終了時、培
養液中に生成したB-41群抗生物質のうちB-
41 Dの占める割合は約0.5%、Eの割合は1.8
%及びFの割合は0.5%であった。なお添加物な
しに培養したときD、EおよびFの占める割合
は、それぞれ0.1%、0.5%および2%であつた。

DL-バリン-2- ^{14}C を添加して培養した
培養物を尸過し、固体をメタノール抽出した。
これに水を加えて50mlメタノール溶液にし、
ローヘキサンで抽出した。得られたローヘキサ
ン層は蒸留で脱水後、減圧下で濃縮し、オイル
状物質を得た。このオイル状物質をシリカゲル

カラムさらにローベーカーカラム（メルク社製）で
精製し、B-41物質の各成分を単離した。得ら
れた各成分中の ^{14}C の取り込み、400メガヘル
ツの ^{14}C -NMR及びマス・スペクトルで測定した
ところ、DL-バリン-2- ^{14}C の ^{14}C がB-
41 D、EおよびFのC-25位に特異的に取り
込まれている事がわかつた。

実施例2

実施例1の種培養物をグルコース1g、アス
パラギン0.3g、ロイシン0.3g、リン酸第2
カリウム0.05g、硫酸マグネシウム0.05g、食
塩0.05g、塩化カルシウム0.02g、硫酸亜鉛
0.005g、硫酸マンガン0.001g、硫酸第1鉄
0.002g及び微量のビタミン類からなる培養地20
mlに1mlずつ接種し、L-バリン、イソ酪酸、
2-ケトイソ古草酸、イソカブロン酸及びイソ
ブタノールを第1表に示す条件で添加して、
28℃で3日間振とう培養した結果、第1表に
示す結果が得られた。

添加物	濃度 (g/v%)	添加時間 (スタート後)	D-41 生成量		
			D	E	G
DL-バリン	0.01	0 時	37	0	0.6
"	0.01	48	41	9	0.7
"	0.1	48	34	0	0.5
DL-バリン	0.01	48	35	9	0.5
イソ酪酸	0.005	0	33	7	0.6
"	0.005	48	35	9	0.6
2-ケトイソ酪酸	0.01	0	41	12	0.8
"	0.01	48	43	14	0.8
イソブタノール	0.01	48	33	0	0.6
DL-バリン+	0.05	48	31	11	0.5
イソ酪酸	0.01				
無添加	—	—	17	4	0.2

実施例 2

実施例 1 に示した培養地を調製し、その 600 cc を 2000 cc エルレンマイヤーフラスコに分注

え、28 日のローヘキサンで抽出した。得られたローヘキサン層は蒸留で脱水後、40～45℃ 水浴中で減圧下濃縮すると 2.5 量のオイルが得られた。これを約 3 量のローヘキサンにとかし、あらかじめ 2 量のシリカゲルをローヘキサンでつめてあるカラムに装填せしめ、ローヘキサン：アセトン（85：5）で展開した。その結果目的物質 B-41 D を含有するフラクションを 2.5 量得た。これらを前述と同様の条件で濃縮すると B-41 D の粗結晶が得られた。これをローヘキサン：酢酸エチル（20：1）に溶解後、直ちに放散し、析出する結晶を採取し、B-41 D の精結晶 210 mg を得た。

特許出願人 三 共 株 式 会 社
代 理 人 弁 理 士 橋 出 庄 治

し、蒸留した。これを B-41 D 146 倍を 1 倍量に濃縮し、時間 28 日培養を行ない、この 2000 cc エルレンマイヤーフラスコに 30 量のジヤー・フアノンタに移植した。ジヤー・フアノンタは、グルコース 4 量、大豆油 1 量、コンスタータ 2 量、スクム（ルタ）1 量、コンスタータ・リカー 2 量、食塩 2 量及び CaCO_3 0.05 量を含む培地 2.8 量を仕込み、pH を 7.2～7.5 に調整し、十分に振盪しておいた。培養期間中は、28℃、内圧 0.5 kg/cm^2 に保持した。3 日培養後 DL-バリンを 0.01 量添加しさらに 5 日間培養した。B-41 群微生物の生成量のうち D は 6.6 量（重量比）の割合を占めた。同条件で DL-バリンを添加せず培養した場合に、B-41 D の割合は 3.5 量にとどまった。DL-バリンを添加して得られた培養物 2.8 量の pH を調整後 3 とし、セライト 1 量を加えて加圧ろ過すると約 3 量のケーキが得られた。これを 1.5 量のメタノールで抽出し、戸別し、得られたメタノール抽出液 1.5 量に水 1.5 量を加

手続補正書（自発）

昭和 57 年 11 月 15 日

特許庁長官 石 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和 56 年特許第 178061 号

2. 発明の名称

微生物質 B-41 D、E 及び G の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋本町 3 丁目 1 番地の 6

名称 (185) 三共株式会社

代表者 取締役社長 阿 村 喜 典

4. 代 理 人

居 所 〒140 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 58 号

三共株式会社内

電話 492-3131

氏 名 弁理士 (6007) 橋 出 庄 治

5. 補正により増加する発明の数 なし

6. 補正の対象 明記書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容 別紙の通り

1. 明細書第1頁3行目の「取込み」を「取り込み」と訂正する。
2. 同第1頁3行目の「D-41」を「B-41」と訂正する。

以上

月15日

1 聖地の6

喜典

4号

庄治



PATENT BUREAU OF JAPAN,
OFFICIAL GAZETTE FOR UNEXAMINED PATENTS

Disclosure Number: 58-78594
Date of Disclosure: May 12, 1983
Application Number: 56-178061
Date of Filing: November 6, 1981
Inventors: Michihisa Ono
c/o Sankyo KK Fermentation Laboratories
1-2-58 Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo
Hiroshi Takiguchi
Address as above
Hiroshi Mishima
Address as above
Michiya Terao
Address as above
Applicant: Sankyo KK
3-1-6 Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo

SPECIFICATION

1. Title of Invention

Method of Production of Antibiotics B-41D, E and G

2. Claims

(1) Method of production of antibiotics B-41D, E and G by culturing Streptomyces which is a producer of antibiotic B-41, adding one or more substance selected from a group which includes valine, isobutyric acid, isovaleric acid, 2-ketoisovaleric acid, isocaproic acid, salt or ester of any of the foregoing, isobutanol and its ester to the culture medium.

(2) Method according to Claim (1) in which the organism which produces B-41 is Streptomyces sp. B-41-146.

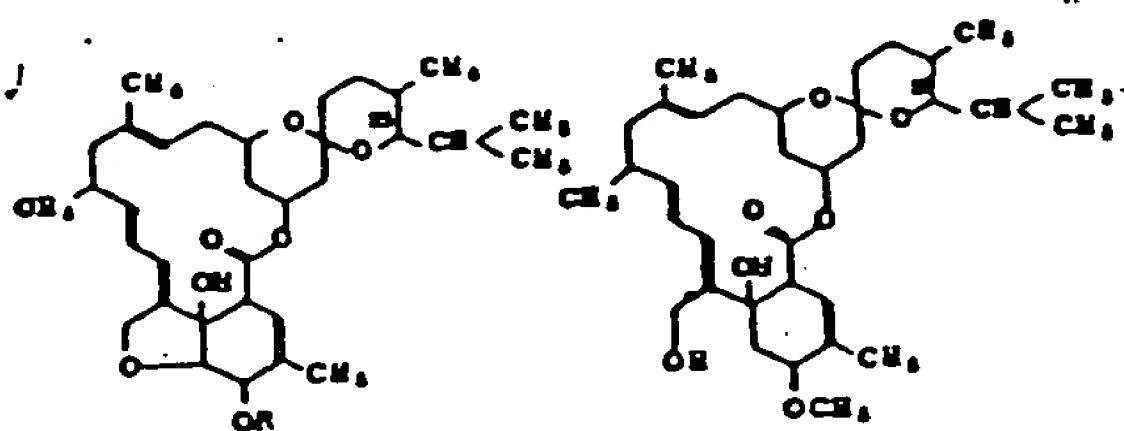
(3) Method according to Claim (2) in which the objective is the production of B-41D.

(4) Method according to Claim (1) in which B-41D is produced by culturing Streptomyces sp. B-41-146 in a medium to which one or more substance selected from a group which includes L- or DL-valine, isobutyric acid, 2-ketovaleric acid and the salt or ester of any of the foregoing is added.

3. Detailed Description of the Invention

This invention concerns a method by which antibiotics B-41D, E and G which are effective as insecticides and acaricides are produced efficiently on industrial scale.

B-41D, E and G are antibiotics produced by culturing Streptomyces species which is a producer of B-41, for example strain B-41-146. The structural formulae are as follows.



B-41 D: R-H

B-41 E

B-41 G: R-CH₃

The efficacy of these agents against animal parasites, especially nematodes, and against mites which parasitize plants and animals has been described in Kokai 56-32481 and in Japanese Patent Applications 55-153141 and 56-7091.

The problem is that when organisms which produce B-41 are cultured in the conventional manner, B-41 A₁, A₃ and B₂ which have a methyl at position 25 and B-41 A₄, B₃ and B₂ which have an ethyl in that position are also produced. There is therefore a demand for a method which would produce higher yields of D, E and G which have an isopropyl in position 25.

We discovered that by adding certain substances to the culture medium for B-41-producing organisms, B-41 D, E and G are obtained in high yields.

This invention concerns a method of production of B-41 D, E and G by adding to the culture of B-41-producing Streptomyces one or more substance selected from a group comprised of valine, isobutyric acid, isovaleric acid, 2-ketoisovaleric acid, isocaproic acid, salt or ester of the above, isobutanol and its ester.

B-41-producing strains such as Streptomyces B-41-146 are registered as FERM 1438 at the Agency of Industrial Science and Technology, MITI. The microbiological properties of the strain are given in detail in Kokai 50-29472. The organisms which are used in this invention were obtained by modifying strain B-41-146 by methods such as irradiation with X-ray, UV and radioactive rays or by means of mutagens, and include producers of B-41 D, E and G.

Valine used in our method may be the L isomer or the DL form. Among valine, isobutyric acid, isovaleric acid, 2-ketoisovaleric acid and isocaproic acid, L or DL valine, isobutyric acid and 2-ketoisovaleric acid are especially suitable. Their salts may be those of sodium or potassium. Their esters may be methyl, ethyl, or n-butyl which are lower alkyl esters, or benzyl ester. Isobutanol and its ester may also be used. Examples of the latter are esters of lower saturated aliphatic acids such as acetic and propionic acids. In experiments using ¹³C-labeled compounds, it was found that isopropyl group was specifically incorporated at position 25.

The amount of additive in the culture medium should be in the range of 0.001-1 w/v%, preferably 0.005-0.01 w/v%. Addition may be made at the time of preparation of the medium or during culture at any suitable step.

The culture medium may be any preparation which provides the necessary nutrients to the organism aside from the specific additives. The carbon source may be glucose, sucrose, starch, glycerin, millet jelly, molasses or soybean oil. The

nitrogen source may be skimmed milk, soybean powder, wheat germ, meat extract, peptone, yeast cells, corn steep liquor, ammonium sulfate or ammonium nitrate. Calcium carbonate, sodium chloride, potassium chloride and phosphate may also be added as required.

The method of culture, like that used for most antibiotic-producing organisms, should be one which uses a liquid medium, especially deep culture. The conditions include aerobic environment at 22-30°C, usually around 28°C. The pH of the medium should be in the range of 5.5-8.0, preferably near neutrality at 6.5-7.5. Culture is continued until maximum concentrations of B-41 D, E and G are attained. The time required to reach this stage varies with the method of culture, temperature, and composition of the medium, but is usually 5-15 days.

For detection of B-41 components, the following procedure is used. Three ml of the culture is placed in a small test tube, 7 ml acetone is added, and the preparation is shaken to extract the desired material and is then centrifuged. Ten to 20 μ l of the supernatant is allowed to adsorb to TLC plate (made by Merck & Co., Kieselgel 60 F254) and developed with a mixture of dioxane:carbon tetrachloride (18:82) for 4 hours, after which absorption at 245 nm (blank: 380 nm) is measured using a 2-wavelength chromato-scanner. Absorption is compared with that of the model compound and the yield is calculated.

To collect the antibiotics from the culture, adsorbents such as activated carbon, alumina or silicagel, synthetic adsorbent such as Dia-ion HP-10 or HP-20 (made by Mitsubishi Chemicals), fixer such as Avicel (made by Asahi Chemicals) or filter paper, ion exchange resin or filtration agent such as ion exchange gel may also be used. The harvesting method described below is the most effective.

Culture is filtered with the aid of filtration helper such as diatomaceous earth, and the cake is extracted with methanol. Water is added to the extract and the preparation is extracted with n-hexane and concentrated under reduced pressure to obtain an oily material containing the desired substance. This material is adsorbed with silicagel (Kakogel C-200) and eluted with a mixture of n-hexane:acetone (95:5) to obtain fractions containing D, E and G. Each fraction is concentrated under reduced pressure, and the residue is dissolved in a small volume of a mixture of n-hexane:ethyl acetate (20:1) and allowed to stand at room temperature, B-41 D, B-41 E and B-41 G are obtained each in its crystalline form.

With the procedure of our invention, the yields of D, E and G are excellent and the total yield is high, so that separation and purification are made easy. The procedure would be highly useful in industry.

The invention is described in detail in the examples which follow.

Example 1

Stock culture medium (sucrose 1%, polypeptone 0.35%, K_2HPO_4 0.05%) was placed in 500 ml Erlenmeyer flasks, 100 ml per flask and sterilized. One loopful of strain B 41-146 was inoculated into each flask and incubated at 28°C for 48 hours to obtain stock cultures.

One ml of the stock culture was inoculated into a 100 ml Erlenmeyer flask containing 20 ml of the basic medium (glucose 4%, soybean powder 1%, skimmed milk 1%, NaCl 0.3%, corn steep liquor 0.2% and $CaCO_3$ 0.05%) and shake-cultured at 28°C for 3 days. DL-valine-2- ^{13}C was added at 0.01 w/v% and culture was continued for 2 more days, at the end of which time the proportion of D in the B-41 antibiotics was about 65%, that of E, 18% and that of G, 5%. When the additive was not used, the proportions of D, E and G were 37%, 9% and 2%, respectively.

The culture obtained with the addition of DL-valine was filtered and the cells were extracted with methanol. Water was added to obtain a 50% solution which was then extracted with n-hexane. The n-hexane layer was dehydrated with Glauber's salt and concentrated under reduced pressure to obtain an oily substance. This material was purified by means of silicagel column and the Merck rover column and each component was isolated. Incorporation of ^{13}C was determined by 400 MHz ^{13}C -NMR and MS. It was found that ^{15}C of DL-valine-2 was specifically incorporated at position 25 of D, E and G.

Example 2

One ml of stock culture was transferred to 20 ml of medium composed of glucose 6%, asparagine 0.3%, leucine 0.5%, dipotassium phosphate 0.05%, magnesium sulfate 0.05%, sodium chloride 0.05%, calcium chloride 0.02%, zinc sulfate 0.005%, manganese sulfate 0.001%, ferrous sulfate 0.002% and trace amounts of vitamins. L-valine, isobutyric acid, 2-ketoisovaleric acid, isocaproic acid and isobutanol were added under the conditions indicated in Table 1. After shake-culturing at 28°C for 8 days, the results shown in the table were obtained.

Example 3

Six hundred ml of stock culture was placed in a 2000 ml Erlenmeyer flask and sterilized. One loopful of culture of strain B-41-146 was inoculated and cultured for 48 hours at 28°C. The contents of two such Erlenmeyer flasks were transferred to a 30-liter jar fermentor which contained 20 liters of sterilized medium of pH 7.2-7.5, containing glucose 4%, soybean powder 1%, cornstarch 0.5%, skimmed milk 1%, corn steep liquor 0.2%, sodium chloride 0.3% and $CaCO_3$ 0.05%. During the culture, the temperature was maintained at 28°C and the internal pressure at 0.5 kg/cm². After 3 days of culture, 0.01% DL-valine was added and culture was continued for 5 more days. Of the total B-41 antibiotics, D constituted 68% (by weight). When

Table 1

Additive	Conc. (w/v%)	Time of addition*	% of total B-41		
			D	E	G
L-valine	0.01	0 hr	37	0	63
"	0.01	4.8	41	3	56
"	0.1	4.8	34	0	66
DL-valine	0.01	4.8	36	3	61
Isobutyric acid	0.005	0	33	7	60
"	0.005	4.8	35	3	62
2-Ketoisovaleric acid	0.01	0	41	12	47
"	0.01	4.8	43	14	43
Isobutanol	0.01	4.8	33	0	67
L-valine	0.05				
+ Isobutyric acid	0.01	4.8	31	11	58
None	—	—	37	4	59

* Hours after the start of culture

culture was maintained without the additive, the proportion of D was only 35%. When 20 liters of culture obtained with the addition of DL-valine was adjusted to pH 3 with sulfuric acid and the culture was filtered under pressure with the addition of 1 kg celite, a cake of about 3 kg was obtained. This was extracted with 15 liters of methanol and filtered. To 15 liters of the methanol solution, 10 liters of water was added and the preparation was extracted with 20 liters of n-hexane. The n-hexane layer was dehydrated with Glauber's salt and concentrated under reduced pressure at 40-45°C in a water bath, 23 g of oil was obtained. This was dissolved in about 30 ml n-hexane and adsorbed on a column containing 2 kg silicagel and n-hexane. Development was done with n-hexane:acetone at 95:5, to obtain 2.5 liters of fraction containing B-41 D. This was concentrated in the manner described above to obtain crude crystals of B-41 D. These were dissolved in n-hexane:ethyl acetate at 20:1 and allowed to stand at room temperature. The crystals which formed were filtered to obtain 210 mg of purified crystals of B-41 D.